

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 58018374
PUBLICATION DATE : 02-02-83

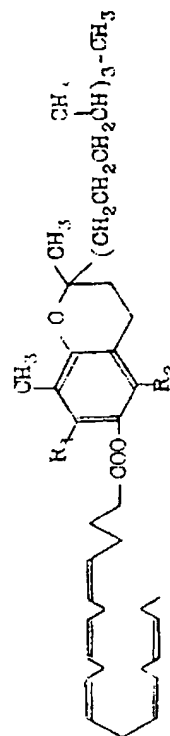
APPLICATION DATE : 27-07-81
APPLICATION NUMBER : 56117447

APPLICANT : NITSUSUI SEIYAKU KK;

INVENTOR : HASEGAWA TERUAKI;

INT.CL. : C07D311/72

TITLE : EICOSAPENTAENOIC ACID
TOCOPHEROL ESTER



ABSTRACT : NEW MATERIAL: The compound of formula (both R_1 and R_2 are methyl, or one of R_1 and R_2 is H and the other is methyl).

USE: Remedy and preventive for arteriosclerosis, cardiac infarction, cerebral infarction, diabetes, menopausal disorder, etc.

PROCESS: The compound of formula is prepared by esterifying tocopherol with eicosapentaenoic acid either by using a condensation agent such as dicyclohexyl carbodiimide, trifluoroacetic anhydride, etc., or by using a reactive derivative of eicosapentaenoic acid such as halide, anhydride, active ester, etc.

COPYRIGHT: (C)1983,JPO&Japio

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—18374

⑮ Int. Cl.³
C 07 D 311/72

識別記号

庁内整理番号
7169—4C

⑯ 公開 昭和58年(1983)2月2日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ エイコサペンタエン酸トコフェロールエステル

⑰ 発明者 長谷川輝明
栃木県下都賀郡野木町大字丸林
417—5

⑱ 特 願 昭56—117447
⑲ 出 願 昭56(1981)7月27日
⑳ 発 明 者 村田敏郎
静岡市北1765—103

㉑ 出 願 人 日水製薬株式会社
東京都豊島区駒込2丁目5番11
号
㉒ 代 理 人 弁理士 有賀三幸 外2名

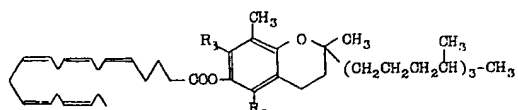
明 細 書

1. 発明の名称

エイコサペンタエン酸トコフェロールエステル

2. 特許請求の範囲

1. 次式(I)

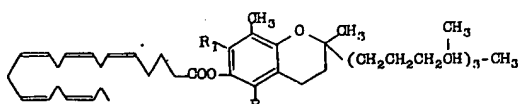


(I)

(式中、 R_1 及び R_2 はともにメチル基か、あるいは一方が水素原子で他方がメチル基を示す)で表わされるエイコサペンタエン酸トコフェロールエステル。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規なエイコサペンタエン酸トコフェロールエステル、更に詳細には、次式(I)、



(I)

(1)

(式中、 R_1 及び R_2 はともにメチル基か、あるいは一方が水素原子で他方がメチル基を示す)で表わされる消化管からの吸収がよく、高い血小板凝集阻害活性を有するエイコサペンタエン酸トコフェロール(以下、EPAトコフェロールエステルと略称することもある)に関する。

エイコサペンタエン酸(以下、EPAと略称することもある)及びそのエステル、アミド等が心筋梗塞、脳梗塞等の血栓性疾患の治療及び予防に有効であることは既に知られている(特開昭55-15444号)。

しかし、EPAは5個の不飽和結合を有する脂肪酸であり、EPA、そのエステル及びグリセライドは極めて過酸化物をつくり易い性質を有しているため、これを生体に投与すると、生体中に有害な脂質過酸化物が増加することが予想されている。

そこで、本発明者は、EPAの斯かる欠点を克服せんと種々のEPA誘導体を合成し、検討を行った。就中、特にトコフェロールは強力な抗酸化

(2)

剤として、生体中の脂質過酸化物の生成を防止し、生体膜を安定化させる作用を有し、また生殖腺に対する賦活作用、末梢循環の促進、サクシニクオキシダーゼ等の酵素に働いて物質代謝に影響を与える作用、血小板凝集抑制作用を有するため、現在更年期障害、動脈硬化、静脈血栓症、糖尿病等の成人病の治療に広く使用されている。斯かるトコフェロールの作用に着目し、EPAとトコフェロールとを結合させてEPAトコフェロールエステルを合成し、その作用を試験した結果、EPAとトコフェロールの混合物に比較し消化管からの吸収が極めてよく、EPA投与に比べ脂質過酸化物の生成が少ないと共に、極めて優れた血小板凝集抑制作用を有することを見出し、本発明を完成した。

従つて、本発明は、優れた血小板凝集抑制作用を有すると共に、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞、糖尿病、更年期障害等広く成人病の治療及び予防に効果を有するEPAトコフェロールエステルを提供するものである。

(3)

EPAの腸管への取り込み：

ラット空腸を摘出し、反転した後、その500mgを取り、約5mm間隔で輪切にし、反転腸管標本とした。これを19mlの等張栄養液（クレブス-リンゲル（Krebs-Ringer）緩衝液）に浮遊させ、これにEPA・dl- α -トコフェロールエステル又はEPAエチルエステルの1%-アラビアゴム懸濁液を1ml添加し、37℃にて酸素（5%-CO₂含有）気流中で30分間及び60分間インキュベーションをおこなつた。インキュベーションにおけるEPA・dl- α -トコフェロールエステル又はEPAエチルエステルの最終濃度は各々、EPA換算で1mg/mlとなるように調整した。インキュベーション終了後腸管片を取り出し、生理食塩水で洗浄し、これにクロロホルム-メタノール（2：1）混液10mlを加えて、ポッター氏ホモジナイザーでホモジナイズし、脂質を抽出した。抽出液を3000rpmにて10分間遠心分離した後、その上澄液5mlを取り減圧下で乾固した。

(5)

本発明のEPAトコフェロールエステルは、例えば、EPAとトコフェロールを通常のエステル化法によつてエステル化する方法によつて製造される。

原料のEPAは水産物油脂から分離されるものであり、必ずしも純粋なものでもよい。また、トコフェロールとしては、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール又はこれらの混合物のd体、 Δ 体およびdl体の何れをも使用できる。

エステル化法としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、無水トリフルオル酢酸等の縮合剤を使用する方法、EPAのハライド、無水物、活性エステル等の反応性誘導体を使用する方法などが有利に利用できる。

斯くして得られる本発明のEPAトコフェロールエステルの薬理作用を試験した結果は次のとおりである。

1. EPAトコフェロールエステルの吸収

(i) 実験1

(4)

この脂質分画中のEPAを次の方法によつて定着した。すなわち、脂質分画に5%-KOH（エタノール-水（9：1））溶液5mlを加え、45分間加熱還流し、これに水10ml、ヘキサン5mlを加えて分液ロートに移し、ヘキサン層を除去した。水層には6N-HClを加えてpH1.0以下とし、更にこれにヘキサン5ml及び内部標準物質（C_{22:0}脂肪酸31mg/50mlヘキサン）0.3mlとを加えて振盪し、脂肪酸をヘキサンによつて抽出した。この抽出操作を3回おこない、抽出したヘキサン層を合せて水洗した。水洗は水層のpHが中性になるまでおこない、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムで脱水した後小バイアル瓶に移し、窒素気流下で乾固した。このバイアル瓶に14%BF₃-メタノール-ベンゼン（35：35：30）溶液0.2mlを加えて密栓し、100℃にて10分間加熱してメチルエステル化をおこなつた。これを10分間放冷後、更に水0.2ml、ヘキサン0.4mlを加え1分間振盪して、このヘキサン層をガスクロマトグラフ

(6)

に注入してEPAメチルエステルを定量した。ガスクロマトグラフはDEGB 40 mの毛細管カラムを使用した。カラム温度は180℃であった。

その結果は表-1のとおりである。表-1に示すごとく、インキュベーションを30分間おこなった場合、また60分間おこなった場合、いずれもEPA・dL- α -トコフェロールエステルはEPAエチルエステルに比べ高い吸収率を示した。

表-1

	EPA吸収量	
	インキュベーション 30分	インキュベーション 60分
EPA・dL- α -トコ フェロールエステル	124 $\mu\text{g/g}$	138 $\mu\text{g/g}$
EPAエチル エステル	102 $\mu\text{g/g}$	119 $\mu\text{g/g}$

(7)

として投与した方がEPAエチルエステルとトコフェロールとの混合物として投与した場合に比べて、血中EPA濃度が高く、EPA・dL- α -トコフェロールエステルはEPAエチルエステルよりも吸収が良いことが明らかとなった。

II. 血小板凝集に対する作用

実験3

ウィスター系雄性ラットを1群5匹とし、3群合計15匹を使用してEPA・dL- α -トコフェロールエステルの血小板凝集に対する作用をEPAエチルエステルの場合と比較した。これらのうち、1群にはEPA・dL- α -トコフェロールエステル、また他の1群にはEPAエチルエステルを、EPA換算で1日あたり100 mg/kg にて経口によつて強制投与した。残りの1群は対照群とし、これには生理食塩水を投与した。薬物は1日1回1ヶ月間投与を続け、1ヶ月後に採血してコラーゲンによる血小板凝集能を比較した。

(9)

(II) 実験2

EPA血中濃度：

1群5羽とし、2群合計10羽の日本白色家兎を使用し、これを24時間絶食し、1群にはEPA・dL- α -トコフェロールエステル、また他の1群にはEPAエチルエステルとdL- α -トコフェロール混合物を投与したときのEPAの血中濃度を比較した。各々の薬物の投与量はEPA換算で500 mg/kg とし、経口によつて強制投与した。血液は投与直前及び投与から1、3、5、7、10、24時間後にヘパリン添加の注射筒によつて耳静脈より採血した。この血液を3000 rpmにて10分間遠心分離して血漿を分離し、その0.5 mlにクロロホルム-メタノール(2:1)混液8 mlを加え10分間振盪して脂質を抽出した。この脂質中のEPAの量を実験1と同じ方法で定量し、EPA血中濃度を $\mu\text{g/ml}$ 単位で算出した。

その結果は第4図のとおりである。第4図に示すごとく、EPAはトコフェロールエステル

(8)

血小板凝集能は次の方法で測定した。3.8 % クエン酸ナトリウム0.5 ml入れた注射筒により、ラット腹部大静脈より4.5 ml採血した。これを1000 rpmにて10分間遠心分離してその上層を血小板豊富な血漿(PRP)として採取し、更に残余の下層を3000 rpmにて10分間遠心分離して、その上層を血小板の少ない血漿(PPP)とした。血小板凝集能の測定は、一般に用いられる血小板凝集計を使用し、ボルン及びオプライエンの方法に従った。すなわちPRPに一定濃度の凝集惹起物質(コラーゲン)を加えて37℃に保温し、攪拌をおこない、凝集による光の透過度の増大を付属の記録計によつて描記した。

コラーゲンの最終濃度が2及び4 $\mu\text{g/ml}$ のときの凝集率は表-2のとおりである。表-2から明らかな様に、薬物投与群の凝集率は対照群のそれに比べて小さく、EPAの血小板凝集抑制作用が認められた。更に、EPA・dL- α -トコフェロールエステルとEPAエチルエス

(10)

ルとの比較では、EPA・dl- α -トコフェロールエステルの方が血小板凝集抑制作用が強いことが明らかとなった。

表-2

投与群	凝集率	
	2 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$
EPA・dl- α -トコフェロールエステル	3.7 %	11.0 %
EPAエチルエステル	8.8 %	18.5 %
対照群	16.4 %	31.6 %

Ⅲ. 脂質過酸化物の形成

実験4

実験3の採血後直ちに動物の肝臓及び腎臓を摘出し、臓器中脂質過酸化物の量を測定した。脂質過酸化物は、脂質の過酸化によつて生ずるマロンジアルデヒドを、八木ら（「ビタミン」、49巻、403頁、1957年）の方法に従つて、チオバルビツル酸反応物による蛍光を測

(11)

14, 17-エイコサペンタエン酸5.43gを入れ、これに塩化メチレン20mlを加えて攪拌し、溶解させた。これに塩化メチレン30mlに溶解させたdl- α -トコフェロール7.73gを加え、更にDCC4.10g及び4-ジメチルアミノピリジン0.658gを加え、攪拌下窒素気流中室温にて24時間反応させた。反応後、反応液をキーゼルゲル300gを充填したカラムに注ぎ、ベンゼンを溶出溶媒としてカラムクロマトを行い、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸・dl- α -トコフェロールエステル9.8g（収率76%）を得た。

元素分析値

計算値(%) : C 82.29, H 10.99

実測値(%) : C 82.23, H 10.94

赤外線吸収スペクトル : 第1図

^{13}C -NMRスペクトル : 第2図

^1H -NMRスペクトル : 第3図

MS : 分子母ピーク 714

溶解性 : 水に不溶、エタノール、ベンゼン、ヘキ

(13)

定することにより定着した。

その結果は表-3のとおりである。表-3に示すごとくEPA・dl- α -トコフェロールエステル投与群は、他の群に比べ、組織中のマロンジアルデヒドの生成量が少なく、EPA・dl- α -トコフェロールエステルが脂質過酸化物形成に対し防御作用のあることが認められた。

表-3

投与群	組織中のマロンジアルデヒド値 (nm / g tissue)	
	肝臓	腎臓
EPA・dl- α -トコフェロールエステル	401.5	313.7
EPAエチルエステル	485.4	368.1
対照群	432.3	349.2

次に実施例を挙げて説明する。

実施例1

褐色の200ml容フラスコに5, 8, 11,

(12)

サンに可溶

性状 : 淡黄色油状物質

実施例2

褐色の300ml容フラスコに5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸2.25gを入れ、これにベンゼン50mlを加えて攪拌し、溶解させた。攪拌下これに無水トリフルオル酢酸5.85mlを加え、窒素気流中室温で40分間反応させ、次いでベンゼン50mlに溶解させたdl- α -トコフェロール3.61gを加え、更に24時間攪拌下反応させた。反応後、トリフルオル酢酸及び副生成物のトリフルオロ酢酸トコフェロールを中和及び加水分解するため、反応液に10%炭酸ナトリウム100mlを0℃で加え攪拌した。ベンゼン層をとり、水洗後、ベンゼンを減圧下留去し、残留物に少量のベンゼンを加え、キーゼルゲル150gを充填したカラムに注ぎ、ヘキサン-エーテル(9:1)で溶出して、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸・dl- α -トコフェロールエステル2.73g（収率51%）

(14)

を得た。

元素分析値

計算値(%) : C 82.29, H 10.99

実測値(%) : C 82.25, H 10.95

4. 図面の簡単な説明

第1図はエイコサペンタエン酸・dl-α-トコフェロールエステルの赤外線吸収スペクトル、第2図は同¹³C-NMRスペクトル、第3図は同¹H-NMRスペクトルを示し、第4図はエイコサペンタエン酸・dl-α-トコフェロールエステルとエイコサペンタエン酸エチルエステルとを経口投与したときの血中濃度の比較を示す。

以 上

出願人 日水製薬株式会社

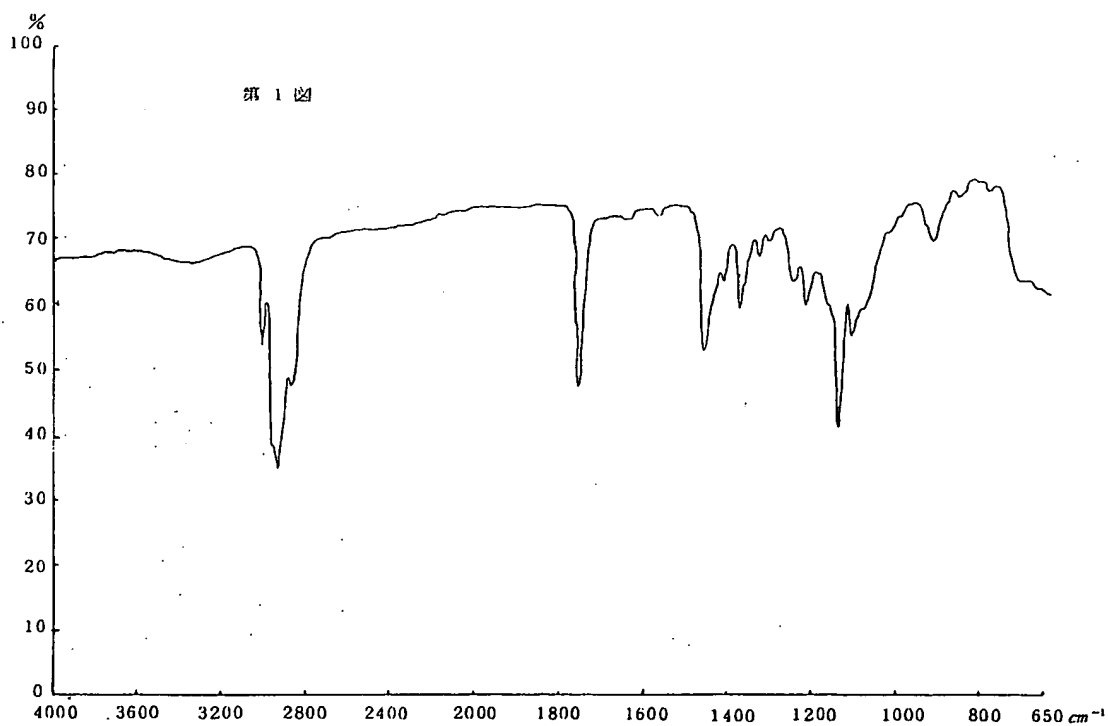
代理人 弁理士 有 賀 三 幸

弁理士 高 野 登 志 雄

弁理士 小 野 信 夫

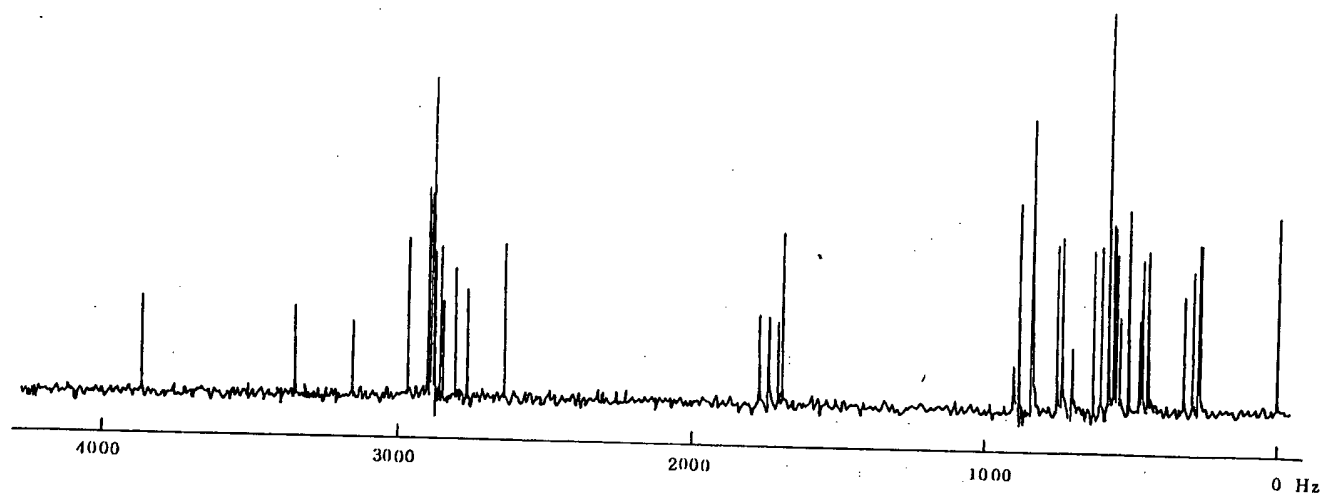


(15)

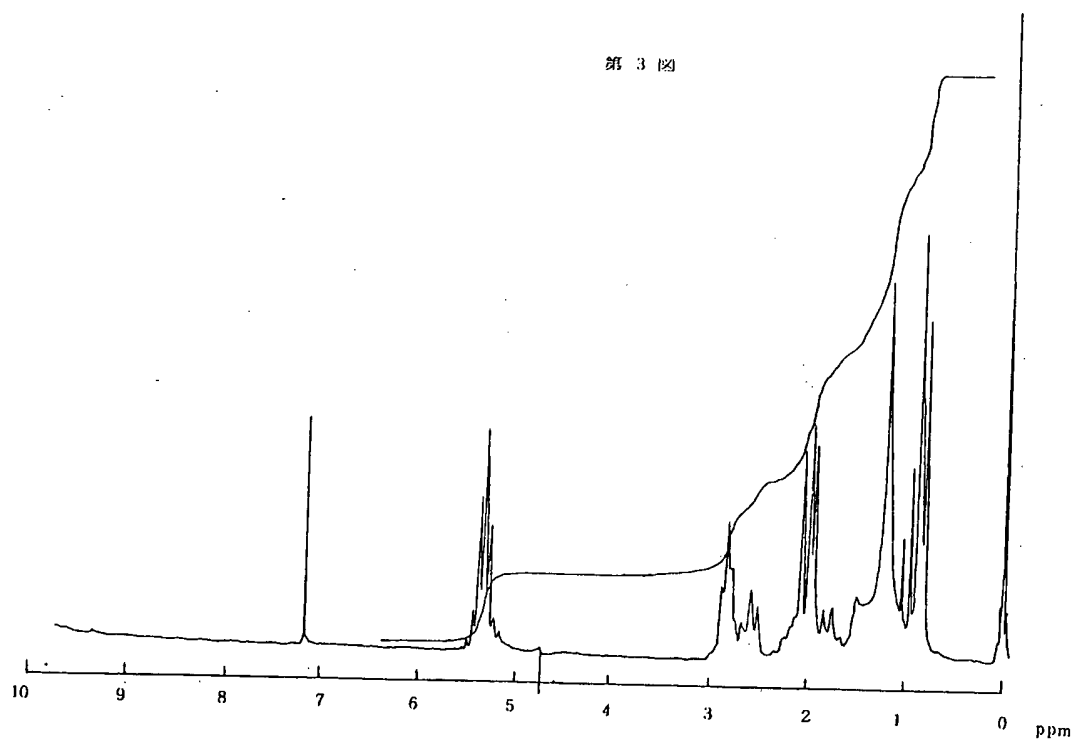


特開昭58-18374(6)

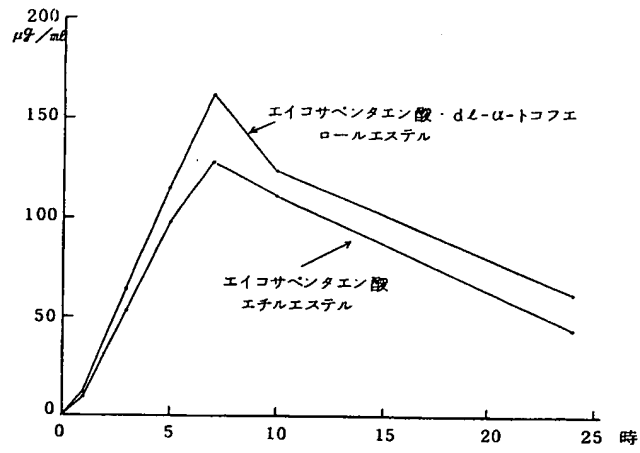
第 2 図



第 3 図



第4図



THIS PAGE BLANK (USPTO)